

プロスタグランジン細胞外放出トランスポーターを 標的とする新規治療戦略の基盤構築に関する研究

著者	田中 伸明
号	54
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第535号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125862

論文内容要旨

プロスタグランジン細胞外放出トランスポーターを標的とする 新規治療戦略の基盤構築に関する研究

病態分子薬学分野 田中 伸明

プロスタグランジン (PG) は、アラキドン酸 (AA) など炭素数 20 の多価不飽和脂肪酸から生合成される脂質メディエーターの一つである。PG は多様な疾患に関与することが知られており、例えば、PG 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) のノックアウトマウスを用いた検討から、COX-1 は AA 誘発性炎症、COX-2 はカラゲニン誘発性炎症に関与することが報告されている。そのため、COX の阻害薬である非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は抗炎症薬・鎮痛薬として使用されている。また、受容体のノックアウトによる表現型解析も既に行われており、PGD₂ の受容体である Chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells (CRTH2) は、アレルギー性炎症が生じた部位への Th2 細胞の遊走や Th2 サイトカインの産生に関与することが明らかとなっている。一方でアレルギー性炎症時には PGE₂ が EP3 を介してアレルギー反応を抑制することも知られている。このことから、PGD₂ と PGE₂ の両者を低下させる NSAIDs は有効でなく、CRTH2 選択的阻害薬がアレルギー性疾患に対する治療薬として使用されている。さらに、近年は COX の下流に存在する各種 PG の合成酵素も標的とされた創薬研究が進められている。PGE₂ 合成酵素である mPGES-1 をノックアウトした場合、PGI₂ の生合成量が減少せず (PGI₂ 代謝物排泄量が野生型と比較し 60 % 増加)、血圧や血栓形成に影響を及ぼさなかったと報告されている。また、mPGES-1 ノックアウトマウスでは中枢性感作が抑制されたことから、mPGES-1 阻害薬が NSAIDs より安全性の高い鎮痛薬になると期待されている。これらの背景から、PG の合成や作用発現に関与するタンパク質を標的とすることで、疾患治療に有用な薬物の創生が期待される。

PG は細胞内で生合成された後、近傍細胞膜上に発現する受容体に結合するために、細胞外へ放出されることが必須である。このことから、PG の細胞外放出過程も疾患治療のための標的となりうると考えた。これまで、ATP-binding cassette transporter C4 (ABCC4) が PG の細胞外放出に寄与することが示されてきた。しかしながら、ABCC4 を標的としたときの効果を予測するには、情報が限られている。そこで本研究では、まず ABCC4 を標的とすることの妥当性を評価するために、PG の動態における ABCC4 の役割について、次の 2 点を明らかにす

ることが必要と考えた。

●**ABCC4 が PG 細胞外放出トランスポーターとして機能している細胞種**：PG は疾患の発症や進行だけでなく生理機能の調節にも寄与することから、疾患に関与する PG の作用を選択的に抑制することが副作用発現の抑制に必要となる。このことから、ABCC4 が機能する細胞種を明らかにすることで、特定の細胞からの PG 放出を抑制できる可能性があるかについて、評価できる。

●**ABCC4 を介した細胞外放出の PG 選択性**：PG 細胞外放出トランスポーターを抑制することにより、その効果が NSAIDs に類似するか、下流の合成酵素の阻害薬に類似するのかを明らかにできれば、どの疾患に対して有用となるかを評価できる。

前者を明らかにするために複数の細胞株を評価する必要がある、しかもそれぞれが異なる PG 生合成量を示す可能性が高い。多くの細胞株に対応するために、高感度な分析を必要とした。また後者は、AA を出発物質とする 2-series PG と、エイコサペンタエン酸を出発物質とする 3-series PG の細胞外放出における ABCC4 の寄与を同時に評価することで解明できると考えた。このことから、2-series PG と 3-series PG を網羅的に測定できる手法が必要となった。さらに、細胞外量とは分けて細胞内量を測定する手法があれば、細胞内濃度と速度論パラメーターの関係性からトランスポーターを介した細胞外放出における PG 選択性を評価できると推察した。以上の条件を全て網羅する分析法は報告されていなかったことから、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法による 2-series PG (PGE₂、PGD₂、PGF_{2α}、TXB₂、6-keto PGF_{1α}) と 3-series PG (PGE₃、PGD₃、PGF_{3α}、TXB₃、Δ¹⁷-6-keto PGF_{1α}) の細胞外・細胞内量測定法を構築した。

続いて、ABCC4 が PG 細胞外放出トランスポーターとして機能している細胞種を明らかにすべく、PG の中で ABCC4 に対し高い親和性を示す輸送基質であった PGD₂に着目し(表 1)、由来組織の異なる培養細胞を用いて

表 1 ABCC4 を介した輸送の速度論パラメーター

	K_m (μ M)	V_{max} (pmol/mg protein/30 sec)	V_{max}/K_m (μ L/mg protein/30sec)
2-series PGs			
PGE ₂	0.8 ± 0.1	3.2 ± 0.2	4.2
PGF _{2α}	5.3 ± 0.7	26.3 ± 1.6	5.0
PGD ₂	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	3.0
3-series PGs			
PGE ₃	2.9 ± 0.1	15.4 ± 3.9	5.3
PGF _{3α}	12.1 ± 1.3	33.0 ± 6.6	2.7
PGD ₃	1.1 ± 0.4	4.1 ± 0.2	3.6

PGD₂細胞外放出における ABCC4 の寄与を調べた。ヒト小脳髄芽細胞由来 TE671 細胞の PGD₂細胞外量は、ABCC4 選択的阻害薬 Ceefourin™ 1 (10 μ M) で減少しなかった。TE671 細胞で

機能する PGD₂ 合成酵素であるリポカリン型 PGD 合成酵素が小胞体内に発現することから、エキソサイトーシスの寄与が大きい可能性を考えた。エキソサイトーシス阻害薬 Exo1 (100 μM) で前処理することにより PGD₂ 細胞外量は 65 % 有意に減少したことから、TE671 細胞では PGD₂ の細胞外放出において ABCC4 ではなくエキソサイトーシスが寄与

することを明らかにした。この結果から、別の PGD₂ 合成酵素であり細胞質中に局在する造血管型 PGD 合成酵素を発現する細胞において、ABCC4 が PGD₂ 細胞外放出に寄与すると推測した。そこで、ヒト肥満細胞由来 HMC-1 細胞を用いた結果、PGD₂ 細胞外量は CeefourinTM 1、ABCC4 siRNA の導入によりそれぞれ 53 %、56-70 % 有意に減少した (図 1)。肥満細胞からの PGD₂ 放出は抗原刺激により亢進することから、次にラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞を用いて、抗原刺激後の PGD₂ 放出における ABCC4 の寄与を調べた。その結果、2.5 μM CeefourinTM 1 存在条件下で細胞外 PGD₂ 量は約 30 % 減少した。以上より、ABCC4 は肥満細胞において PGD₂ 細胞外放出トランスポーターとして寄与することを示した。

次に ABCC4 を介した細胞外放出の PG 選択性を明らかにするために、ABCC4 の輸送基質であり、2-series PG より低親和性であることが判明した PGE₃、PGF_{3α} に着目した (表 1)。これらの PG はヒト肺腺癌由来 A549 細胞において、PGE₂、PGF_{2α} とともに細胞外量・細胞内量のどちらも測定可能であったことから、検討に適すると判断した。

PGE₂ と PGE₃ の推定細胞内濃度はそれぞれ 3.8、4.4 μM と、ABCC4 による輸送の K_m を上回る数値であった。このことから、ABCC4 を介した細胞外放出において PGE₂ と PGE₃ が競合し、より親和性の高い PGE₂ が優先的に輸送されると推測した。ABCC4 阻害薬として MK571 (50 μM) を使用した結果、細胞外 PGE₂/PGE₃ 比は 3.4 から 2.7 へと有意に減少したことから (図 2A)、PGE₂ が優先的に輸送されていることが考えられた。一方、PGF_{2α} と PGF_{3α} の推定細胞内濃度はそれぞれ 0.48、0.53 μM であり、ABCC4 を介した輸送の K_m の 1/10 以下であった。そのため、細胞外 PGF_{2α}/PGF_{3α} 比は MK571

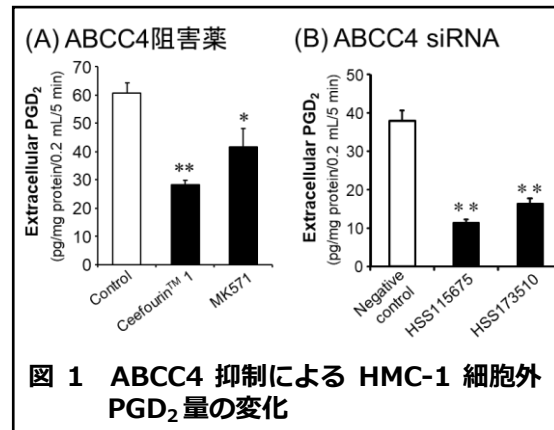


図 1 ABCC4 抑制による HMC-1 細胞外 PGD₂ 量の変化

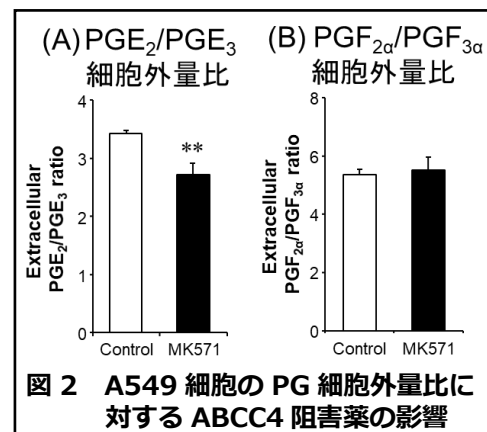


図 2 A549 細胞の PG 細胞外量比に対する ABCC4 阻害薬の影響

で変化しなかった (図 2B)。このことから、PG の細胞内濃度が ABCC4 による輸送の K_m を下回る場合、親和性の違いは PG 輸送の選択性に影響しないことが示唆された。

これまでの検討で PG の細胞外放出において ABCC4 の寄与は部分的であり、ABCC4 阻害薬によっても最大約 50 % しか PG 細胞外量の減少が認められなかった。ABCC4 を標的とした薬剤は効果不十分となることが懸念されたことから、ABCC4 とは別の PG 細胞外放出トランスポーターの探索を試みた。PGE₂ 産生細胞である A549 細胞から膜小胞を作製し、PGE₂ 輸送に関与する駆動力を調べた結果、H⁺勾配が PGE₂ 輸送の駆動力となる可能性を見出した。また、A549 細胞内 pH を 7.7 から 6.9 へ低下させた条件で pH7.4 の緩衝液を添加し、H⁺勾配を形成することで PGE₂ 細胞外放出量は 3.6 倍に増加した。以上の結果から、H⁺勾配を駆動力とするトランスポーターが PGE₂ 細胞外放出に関与することが示唆された。

A549 細胞膜小胞を用いて H⁺勾配依存的 PGE₂ 輸送速度の濃度依存性を検討したところ、PGE₂ 500 μ M で飽和しなかった (図 3A)。このことから、SLC16 ファミリーに属するトランスポーターの関与を考慮し、その輸送基質となりうるモノカルボン酸による PGE₂

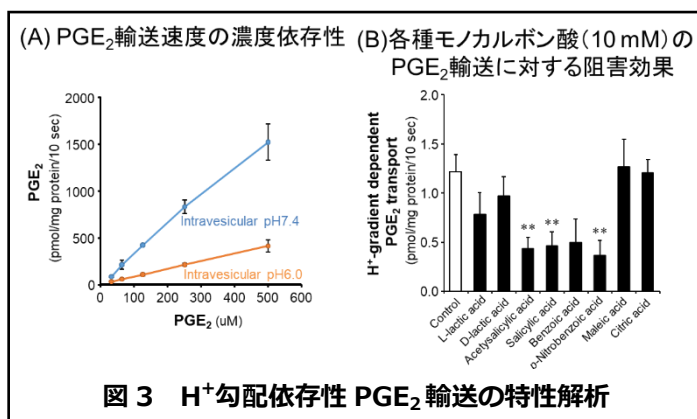


図 3 H⁺勾配依存性 PGE₂ 輸送の特性解析

輸送の阻害を調べた。種々のモノカルボン酸 (10 mM) 共存条件下で PGE₂ 輸送実験を行った結果、アセチルサリチル酸、サリチル酸、*p*-ニトロ安息香酸が 62 - 70 % 有意に PGE₂ 輸送を抑制した (図 3B)。以上から、PGE₂ の細胞外放出に関与する H⁺勾配依存性トランスポーターは、PGE₂ に対する親和性が低く、芳香族モノカルボン酸で阻害される可能性を示した。

本研究の結果から、ABCC4 を標的とすることにより、PG 細胞外放出トランスポーターとして ABCC4 が機能している細胞に対して選択的に、NSAIDs のように幅広い PG の作用を抑制できることが示唆された。また、新たに見出した H⁺勾配依存性輸送を標的とすることで、例えばがん細胞からの PGE₂ 放出を選択的に抑制し、PGE₂ によるがん増殖促進作用やがん免疫抑制作用を抑制できることが期待される。今後 ABCC4 と同様に機能評価を行い、H⁺勾配依存性 PG 細胞外放出トランスポーターの役割を解明することで、治療標的となりうるか評価できると考える。以上から、本研究の成果は PG 細胞外放出トランスポーターを標的とする治療戦略の立案のための情報収集基盤になると期待される。

論文審査結果の要旨

論文提出者： 田中 伸明

論文審査委員（主査）： 寺崎 哲也

論文題目： プロスタグランジン細胞外放出トランスポーターを標的とする
新規治療戦略の基盤構築に関する研究

プロスタグランジン (PG) 類の一連の生合成や代謝反応は古くから創薬標的とされ、PG 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬は抗炎症薬・鎮痛薬として汎用される。しかしながら、COX 阻害は PGD_2 だけでなく PGE_2 を低下させるため、アレルギー性炎症の抑制効果が減弱することから、現在では PGD_2 受容体がアレルギー性疾患の選択的治療薬としてよく用いられる。近年では各種疾患に対し、COX の下流の各種 PG 合成酵素を標的とし、細胞内 PG 量を選択的に制御する治療薬の開発が試みられている。一方、細胞内で合成された PG はいったん細胞外に放出された後に、近傍の細胞膜上の受容体に結合し作用を発揮することから、PG の細胞外排出過程も創薬標的となり得る。こうした背景から、PG の細胞外排出過程に関与するトランスポーターについて、各種 PG 類を分子種ごとに高感度分析可能な LC/ESI-MS/MS を用いて機能解析した。

まず、PG の細胞外放出への寄与が報告されている ATP-binding cassette transporter C4 (ABCC4) が機能する細胞腫を明らかにするために、これに高親和性を示す PGD_2 を用いて阻害物質の効果を調べた。ヒト小脳髄芽細胞由来 TE671 細胞の PGD_2 細胞外量が、ABCC4 選択的阻害物質である CeefourinTM 1 で減少せず、エキソサイトーシスの寄与が大きいことが示唆された。一方、ヒト肥満細胞由来 HMC-1 細胞を用いたところ、 PGD_2 細胞外量は CeefourinTM 1 および ABCC4 siRNA の導入のいずれにおいても有意に減少し、 PGD_2 放出は抗原刺激により亢進した。さらに、ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞でも PGD_2 放出が CeefourinTM 1 で抑制されたことから、ABCC4 は肥満細胞で PGD_2 の細胞外放出トランスポーターとして機能することが判明した。次に、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて、ABCC4 阻害物質である MK571 共存下の PGE_2 、 PGE_3 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 $\text{PGF}_{3\alpha}$ の細胞内外量を比較した。 PGE_2 および PGE_3 の推定細胞内濃度は ABCC4 による輸送の K_m より高く、両者は競合し、より親和性の高い PGE_2 が優先的に輸送されることが判明した。一方、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ と $\text{PGF}_{3\alpha}$ の推定細胞内濃度は K_m より低く、MK571 添加で両者の細胞外量比は変化しなかった。以上の結果から、PG の細胞外放出における ABCC4 の寄与は部分的であり、その阻害薬を見出しても十分な効果が得られないことが示唆された。そこで、さらなる PG 細胞外放出トランスポーターを探索するため、A549 細胞から膜小胞を作成し、 PGE_2 輸送に関与する駆動力を調べたところ、 H^+ 勾配を駆動力とするトランスポーターの関与が示唆された。SLC16 ファミリートランスポーターの関与が考えられたため、基質となり得るモノカルボン酸による阻害効果を調べたところ、芳香族カルボン酸により阻害されることが判った。

以上、ABCC4 の調節により、幅広く PG 作用を抑制できるうえ、新たに見出した H^+ 勾配依存性輸送過程が PGE_2 放出を選択的に抑制する創薬標的となり得ることが判明したことから、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。